

Laser-Scanning-Mikroskop mit einem non-descannten Detektions- und / oder Beobachtungsstrahlengang

In der Laser-Scanning-Mikroskopie wird zur Beobachtung der Fluoreszenzstrahlung häufig das nicht-descannte Detektionsverfahren (NDD) benutzt. Es ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn stark streuende Proben untersucht oder große Eindringtiefen erreicht werden sollen und zur Detektion im LSM-Scan-Kopf nur eng benachbarte Spiegel mit begrenztem Lichtleitwert zur Verfügung stehen. Die Detektion der zu modulierenden Anregung erfolgt dann nicht-descannt extern in der Nähe einer Pupille.

Meist wird die Anregung im UV / VIS-Bereich über einen Zwei-Photonen-Prozeß mit gepulster IR-Strahlung generiert [US 5034613]. Die gesamte emittierte Fluoreszenzstrahlung wird dann der Anregung im konfokalen Volumen des Fokus zugeordnet und kann nach eventuell mehrmaliger Streuung in der Probe im Auflicht- oder Durchlichtkanal detektiert werden. Dazu wird ein hoher Lichtleitwert im Detektionskanal benötigt.

Ein Grundanspruch optimierter Aufbauten besteht daher in der effektiven und probennahen Detektion der Fluoreszenzstrahlung, um das effektive Gesichtsfeld als virtuelle Quelle gestreuter Strahlung zu maximieren. Die Zugänglichkeit in diesen Räumen ist jedoch häufig durch die Schnittstellen des Mikroskopstatives selbst sowie durch die verwendeten Hilfsmittel, wie Pipetten und Elektroden, begrenzt. Eine wesentliche Randbedingung bildet der Detektor selbst, der nicht nur spektrale, sondern auch orts- und winkelabhängige Empfindlichkeiten aufweist.

Ferner muß davon ausgegangen werden, daß die zu benutzende übrige Mikroskopoptik für den regulären Strahlengang ausgelegt ist, und über begrenzte freie Durchmesser verfügt. Um dennoch Streulichtbeschnitt an Berandungen der nachfolgenden Optiken, wie Tubuslinse oder Beleuchtungsoptik im Auflichtkanal, zu vermeiden, sollten im Auflichtstrahlengang Anregung und Emission objektivnah getrennt werden. In der Regel

werden dafür standardmäßig „Push-&-Click“-Teiler in der Reflektorebene der Auflichtkanaleinspiegelung eingesetzt, um größtmögliche Flexibilität zu wahren. Die Begrenzungen der nachfolgenden regulär ausgelegten Optik werden bisher weitgehend hingenommen. Insbesondere ist es vorteilhaft, definierte Schnittstellen, wie den TV-Port, 5 zur Ankopplung für das Detektionsmodul zu nutzen. Mit Lage und Größe einer solchen Schnittstelle werden jedoch wesentliche Randbedingungen für die Streulichttransmission festgelegt.

Das Ziel der beanspruchten Anordnung besteht darin, unmittelbar nach der Trennung von 10 Anregung und Detektion den Strahlengang derart gegenüber dem regulären Strahlengang zu modifizieren, daß ein größtmögliches (beschnittfreies) Sehfeld unter Berücksichtigung der nachfolgenden Optik auf den Detektor abgebildet werden kann.

Dies wird durch die Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der Unteransprüche.

15 Eine vorteilhafte Ausführung besteht in der Positionierung eines optischen Zusatzsystems, vorzugsweise einer Sammellinse im Reflektorböckchen der Auflichtkanaleinspiegelung. Ihre Dimensionierung wird durch den Kompromiß zwischen maximaler Hauptstrahlabknickung und nicht zu großen resultierenden Bündeldurchmessern auf dem Detektor bestimmt. Insbesondere kann die Optimierung so 20 erfolgen, daß das NDD-Modul an einem TV-Port genutzt werden kann.

Abbildung 1 verdeutlicht anhand des Strahlengangs die Wirkung der Anordnung.

Dargestellt ist ein Teil des Strahlenganges eines Laser- Scanning Mikroskopes (siehe z. B. DE 197 02 753 A1) dargestellt, von einer Scannerpupille SP über ein 25 Scanobjektiv SO zur Übertragung des Beleuchtungslichtstrahls, eine Beleuchtungstibuslinse 5 und einen Strahleiter 1 (Hauptfarbteiler zur Trennung von

Anregungs-und Detektionslicht) in Richtung des Objektives (hier ist nur die Objektivpupille 3 dargestellt).

Ein non descannter Detektionsstrahlengang erstreckt sich über 1 und einen Spiegel 2 sowie eine Detektionstibuslinse 4 in Richtung der Detektion, wobei ein weiterer 5 Strahlteiler ST 3 zur Ausblendung eines Beobachtungsstrahlenganges vorgesehen sein kann. Durch Einbringen einer Sammellinse (6) unmittelbar nach der Einspiegelung an Reflektor (1) wird der regulär genutzte Durchmesser am Reflektor (2) verringert und damit eine größere Durchlässigkeit für Streulicht ermöglicht. Man erkennt insbesondere, daß die regulär genutzten Durchmesser vor der Beleuchtungstibuslinse (4) deutlich größer sind 10 als die vor der Detektionstibuslinse (5), welche sich jeweils in gleichem Abstand zum Objektiv befinden und damit den Gewinn direkt veranschaulichen. Im ausgeführten Beispiel läßt sich die Apertur im Randbereich um etwa 15% erhöhen, was einem Helligkeitsgewinn von etwa 30% entspricht.

Realisiert wird das Einbringen der Sammellinse unmittelbar am Reflektor vorteilhaft direkt 15 am Reflektorgehäuse, beispielsweise mit einer Einschubstelle, wobei auch vorhandene Einschubstellen für Filter genutzt werden können. Die Linse kann vorteilhaft auch auswechselbar bzw. ein- und ausschiebbar sein.

Sie kann auch in Detektionsrichtung vor dem Reflektor 2 an seinem Reflektorgehäuse angeordnet sein.  
20 Eine zweite Linse am Spiegel 2 oder in das Spiegelgehäuse integriert kann ebenfalls vorgesehen sein, einzeln oder in Kombination mit der Linse am Strahlteiler. Es kann auch ein Umlenkspiegel in einem Umlenkelement als konvexer oder konkaver Spiegel ausgebildet sein.

**Patentansprüche**

1.

Laser-Scanning-Mikroskop mit einem non-descannten Detektions und / oder Beobachtungsstrahlengang, wobei ein Strahlteiler zur Trennung von Beleuchtungs- und Detektionstrahlengang vorgesehen ist und in Richtung der Detektion mindestens eine Optik zur regulären Übertragung des detektierten Lichtes vorgesehen ist, wobei zwischen dem Strahlteiler und der Optik eine Zusatzoptik zur Verringerung des Durchmessers des abbildenden Strahlenbündels vorgesehen ist.

10 2.

Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 1, wobei die Zusatzoptik eine Sammellinse ist.

3.

Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 1, wobei die Zusatzoptik als diffraktiv optisches Element (DOE) ausgebildet ist.

4.

Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei die Zusatzoptik unmittelbar am Strahlteilergehäuse in Richtung der Detektion angebracht ist.

20 5.

Laser-Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1-4, wobei die Zusatzoptik ins Strahlteilergehäuse integriert ist.

6.

Laser-Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1-5, wobei die Zusatzoptik auswechselbar oder einschiebbar ist.

7.

Laser-Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1-6,  
wobei eine zweite Linse an einem weiteren Umlenkelement oder in dieses integriert  
vorgesehen ist, einzeln oder in Kombination mit dem Zusatzelement am Strahlteiler.

5 8.

Laser-Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1-7,  
mit einer Ausführung eines Umlenkspiegels in einem Umlenkelement als konvexer oder  
konkaver Spiegel.

